

김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육 저해

朴淵姬 · 權正周 · 曹道鉉 · 金秀一

亞洲大學校 環境工學科

(1983년 1월 25일 수리)

Microbial Inhibition of Lactic Strains isolated from *Kimchi*

Yun-Hee Park, Jung-Joo Kwon, Do-Hyun Jo and Su-Il Kim

Dept. of Environmental Engineering, A Jou University Suweon, Korea

Abstract

The inhibitory activity of 20 Lactic strains from *Kimchi* was tested against *Escherichia coli* and other microorganisms. Of the lactic strains investigated, A7 (*Pediococcus cerevisiae*) and C4 (*Leuconostoc* spp.) were the most effective in restricting the growth of test organisms. The mixed culture inoculation of each selected lactic strain and *Escherichia coli* resulted in a drastic reduction in the plate count of *Escherichia coli* after 24 hours. Similar results were obtained when *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were used as test organisms. For all test organisms, the presence of A7 caused a higher death rate constant than that of C4. Addition of catalase in the mixed culture did not prevent inhibition, suggesting that hydrogen peroxide did not cause the inhibition. The filtrate of A7 culture added to *Escherichia coli* showed identical inhibitory action, however heat treatment of filtrate at 80°C 30min. destroyed the inhibitory activity. A7 filtrate treated with trypsin substantially lost the inhibitory effect, but not by pepsin. The results imply that the protein-like compound(s) is the principal inhibitor produced by this lactic strain.

緒 論

여러 종류의 젖산균이 다른 미생물의 생육을 저해하는 특성을 가진 것은 이미 오래 전부터 알려졌으며¹⁾ 이러한 작용을 가진 젖산균을 이용하여 식품의 유해균 또는 식품 관련 병원균의 생육을 억제시키려는 연구가 1970년대에 활발히 진행되었다. 즉 *Lactic streptococci*²⁾, *Lactobacillus bulgaricus*³⁾, *Pediococcus cerevisiae*³⁾가 *Pseudomonas fragi*를 비롯한 호냉성균의 생육을 억제시켰다고 보고되었으며 또한 *Leuconostoc*⁴⁾에 속하는 균주들

도 *Pseudomonas* 등 육류 호냉성균의 생육 억제에 큰 효과를 보였다. 식품 관련 병원균에 대하여는 *Lactic streptococci*가 *Staphylococcus*와 *Salmonella*를⁵⁾, *Pediococcus cerevisiae*는 *Staphylococcus*의 생육과 enterotoxin의 생성을 억제시켰다는 연구결과가 보고된바 있다.⁶⁾ 이러한 젖산균의 생육 저해 작용은 젖산 및 기타 유기산, H₂O₂ 및 항생물질의 생성이 그 원인으로 밝혀져 있다.⁷⁾ H₂O₂가 생육 저해의 주원인이 되는 젖산균은 *Lactobacilli*^{3), 8), 9)}와 *Streptococci*⁵⁾로 알려져 있다.

항생물질로는 *Streptococcus lactis*가 생성하는 Polypeptide구조를 가진 Nisin이 가장 대표적인 것

으로 많이 연구되었으며¹⁰⁾ 이는 유럽 자국에서 식품보존제로 사용되고 있다. 그 외에도 *Lactobacillus acidophilus*도 항생물질을 생성하며¹¹⁾ *Pediococcus cerevisiae*에서도 이와같은 물질을 생성하는 것으로 추측하는 연구결과가 보고되었다.^{3,6,12)}

그러나 우리나라에서는 젓산발효식품을 많이 애용하고 있으나 젓산균의 이러한 특성에 관한 연구는 없었으므로 본 실험에서는 김치로부터 젓산균을 분리하여 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*를 비롯한 식품 관련 미생물에 대한 생육 저해 여부를 조사하고 젓산균과 이들 test organism의 혼합배양중 젓산균의 생육 저해 효과를 test organism의 균수 변화로 측정하였으며 또한 이 실험에서 얻은 균주의 생육 저해 원인을 검토하였다.

材料 및 方法

1. 使用 菌株

젓산균의 생육저해실험에 사용한 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* 및 기타 균주는 “한국 중균협회”에서 분양받았으며 *L. acidophilus*, *Streptococcus lactis*와 yeast균주는 “아주대학교 식품공학실험실”에 보관중인 것을 사용하였다.

2. 젓산균의 분리

常法으로 담근 김치로부터 Rogosa agar¹³⁾를 사용하여 젓산균을 분리하였다. 분리한 균주는 Trypticase say broth¹²⁾에 접종하여 30°C에서 24시간 배양후 4°C에 보관 사용하였다.

3. 젓산균의 screening

Fleming 등¹²⁾이 사용한 seeded agar screening technique을 사용하여 젓산균 colony 주위에 0.5 mm 이상 産育 抵害帶가 생긴 경우 産育 抵害能이 있는 것으로 판정하였다.

4. 젓산균의 동정

Bergy's Manual of Determinative bacteriology¹⁴⁾에 의하였다.

5. 生育 抵害 實驗

E. coli 등 test organism과 젓산균을 동시에 200 ml의 Elliker broth¹⁵⁾에 균수가 약 1×10^5 /ml ~ 1×10^7 /ml 정도 되도록 집중하여 30°C에서 배양하

면서 12시간 또는 24시간마다 1ml씩 취하여 희석한후 각 test organism의 selective media에 접종하여 test organism의 균수만을 측정하였다. Selective media로는 *E. coli*의 측정에는 E.M.B. agar¹²⁾, *Staphylococcus aureus*에는 Chapman agar¹⁶⁾, *Bacillus cereus*에는 cereus selective agar¹⁷⁾를 사용하였다.

6. catalase의 영향

catalase(crude beef liver catalase, Sigma社)를 0.05M phosphate buffer에 1mg/ml로 만들어 millipore filter(pore size 0.45 μ m)로 여과시켜 배양액에 30unit/ml가 되도록 첨가하였다.

7. 젓산균 배양 여액의 처리

젓산균을 Elliker broth¹⁵⁾에 접종 30°C에서 24시간 배양후 millipore filter(pore size 0.45 μ m)로 여과시켜 배양액 200ml에 3ml를 가하였으며 열처리하는 80°C에서 30분간 행하였다. 단백 분해 효소 처리는 Trypsin(from bovine pancreas, Calbiochem사)과 Pepsin(from Hog Stomach Mucosa, Sigma사)을 여액에 각각 100unit/ml가 되도록 가하여 30°C에서 1시간 처리 후 배양액 200ml에 3ml를 가하였다. 단백분해효소의 영향을 고려하여 대조군으로는 각효소를 동일한 농도로 증류수에 녹여 가하였다.

結果 및 考察

1. 生育 抵害범위

Table 1에서는 김치에서 분리한 젓산균중 *E. coli*와 *S. aureus*에 대하여 생육 저해능을 나타낸 20株를 선택하여 두 균주를 비롯하여 *Ps. aeruginosa*, *B. subtilis*, *B. cereus*에 대한 생육 저해 여부를 조사한 결과를 나타내었다.

B4를 제외한 모든 균주가 *S. aureus*의 생육을 저해시켰으며 A7 C4를 비롯한 11株는 다섯 종류의 test organism을 모두 저해시킨 것으로 나타나 비교적 넓은 생육 저해 범위를 보여주었다. 20株중에서 生育 抵害帶가 가장 크게 나타난 A7은 *Pediococcus cerevisiae*로 C4는 *Leuconostoc* spp.로 동정되었다. 이 두 균주로 보다 많은 종류의 미생물에 대한 생육 저해 여부를 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

Fleming¹²⁾은 오이절임에서 분리한 *P. cerevisiae*-

Table 1. Inhibition of test organisms by lactic strains isolated from *Kimchi*

Test Organisms	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>
Lactic Strains					
A1	+	+	+	+	+
A6	+	+	+	+	+
A7	+	+	+	+	+
A10	+	+	+	+	+
A13	+	+	-	-	-
A14	+	+	-	-	-
A17	+	+	+	+	+
A20	+	+	+	+	+
B2	+	+	+	+	+
B3	+	+	+	+	+
B4	+	-	+	+	+
B7	-	+	-	-	+
B8	-	+	+	-	+
B10	-	+	+	+	+
B12	+	+	+	+	+
B13	-	+	+	+	+
B14	-	+	+	+	+
C2	-	+	+	+	+
C4	+	+	+	+	+
C5	+	+	+	+	+

Table 2. Inhibition of microorganisms by *P. cerevisiae* A7 grown on agar surface.

Cultures inhibited	Cultures not inhibited
<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>L. casei</i> KFCC 32827
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>L. bulgaricus</i> KFCC 21202
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>L. acidophilus</i> *
<i>B. coagulans</i> ATCC 7050	<i>Streptococcus lactis</i> *
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>Sacch. cerevisiae</i> Y-10*
<i>S. aureus</i> ATCC 6358	<i>Candida pseudotropicalis</i> *

*Cultures were from collections in the Food Technology Laboratory, A-jou University, Suweon.

FBB61은 *E. coli*, *Ps. aeruginosa*를 저해시키지 못하였고 *S. aureus*, *Bacillus cereus*를 저해시켰다고 보고하였으나 이 실험에서 분리한 A7은 일부 Gram균에 대하여도 저해작용을 나타내어 In-

hibition spectrum이 더 넓었다. Table 1에 나타난 미생물의 예도 C4는 *B. coagulans*와 *S. lactis*를 저해시킨 반면에 A7은 *S. lactis*를 저해시키지는 못했으나 A7과 C4는 공히 *Lactobacillus* spp.와 *Sacch. cerevisiae*, *Candida*에 대하여는 아무런 저해작용을 나타내지 못했다.

2. 혼합배양中的 저해 작용

A7과 C4 두 균주를 각각 *E. coli*와 동시에 접종 혼합 배양하여 젖산균이 *E. coli*의 생육에 미치는 영향을 *E. coli*의 균수 변화를 측정할 결과는 Fig 1에서 보는 바와 같다.

*E. coli*에 대한 저해 효과는 초기부터 나타나 growth rate가 control에 비하여 현저히 감소하였으며 control의 균수가 약 24시간 후부터는 균수가 감소하기 시작하였고 2일 후부터는 더욱 급격히 감소하였다. 두 젖산 균주의 생육 저해 경과를 비교해 보면 24시간까지 growth rate의 억제 효과는 C4가 더 컸으나 후기의 균수를 감소시키는 효과는 A7이 더 강한 것으로 나타났다.

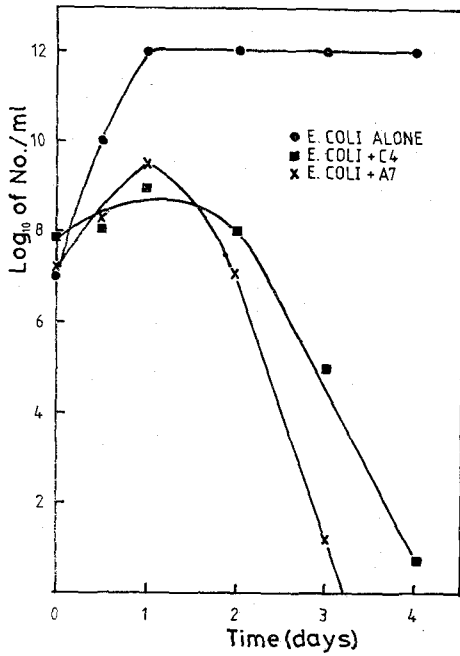


Fig. 1. Effect of lactic strains, A7 and C4 on the growth of *E. coli*.

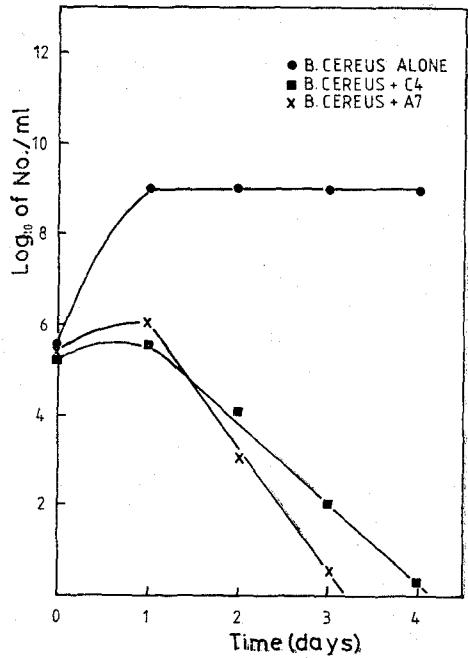


Fig. 3. Effect of lactic strains, A7 and C4 on the growth of *B. cereus*.

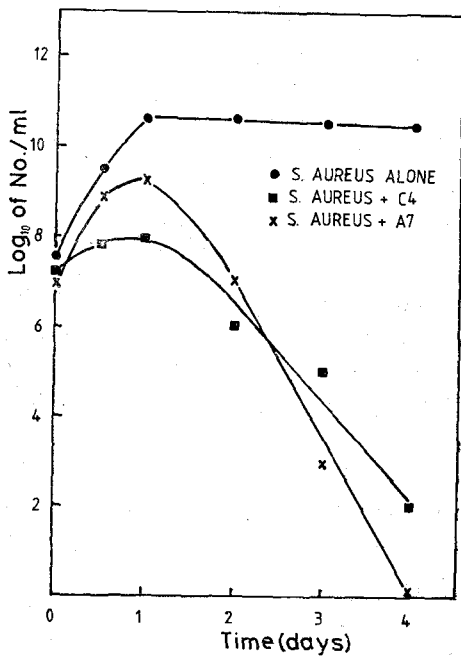


Fig. 2. Effect of lactic strains, A7 and C4 on the growth of *S. aureus*.

Table 3. Death rate constant of test organisms in presence of lactic strains A7 and C4

Test organism	Lactic strains added	Death rate constant (K, hr ⁻¹)
<i>E. coli</i>	A7	0.56
	C4	0.34
<i>S. aureus</i>	A7	0.34
	C4	0.19
<i>B. cereus</i>	A7	0.24
	C4	0.17

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *S. aureus*는 A7과 혼합 배양했을 경우 12시간까지는 growth rate가 거의 영향을 미치지 않았으나 24시간 후부터 균수가 급격히 감소하였다. C4는 24시간까지는 *E. coli*의 경우와 같이 *S. aureus*의 생육을 억제시키는 효과가 컸으나 24시간 이후의 효과는 역시 A7에 비하여 둔화되었다.

*B. cereus*의 경우에도(Fig. 3) 전체적으로 *E. coli* *S. aureus*에서와 비슷한 경향을 보였으나 두 균주 모두 24시간까지의 생육 억제 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

Table 2에서는 두 젖산균주와 혼합 배양시 세 test organism에서 균수가 급격히 감소될 때의 Death rate constant를 구하였다. 세 test organism의 경우 모두 A7과 혼합 배양했을 때가 C4보다 더 높은 death rate constant를 나타내었다.

3. 저해작용의 원인

젖산균의 미생물 생육 저해의 원인은 주로 젖산 등 유기산 생성에 의한 pH의 저하, H₂O₂ 및 polypeptide구조를 갖는 항생물질의 생산에 의한 것으로 밝혀졌으므로 A7의 생육저해 원인을 알아보기 위하여 E. coli에 A7과 A7 배양여액 및 catalase를 가하여 그 영향을 조사하였으며 또한 여액을 단백질 분해효소 및 열처리하여 생육 저해 작용에 미치는 효과를 검토하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 A7배양 여액을 가했을 경우 균수를 혼합 배양 했을 때와 동일한 생육 저해 효과를 나타내었으므로 이는 A7이 생산한 젖산 기타 유기산의 영향이 아님을 알 수 있었다. 젖산균이 H₂O₂의 생성으로 다른 미생물의 생육을 저해시킬 경우는 catalase의 첨가로 그 저해 작용이 거의 없어지는 것으로 나타났으나²³⁾ 이 실험에서는 catalase의 첨가시에도 A7의 E. coli 생

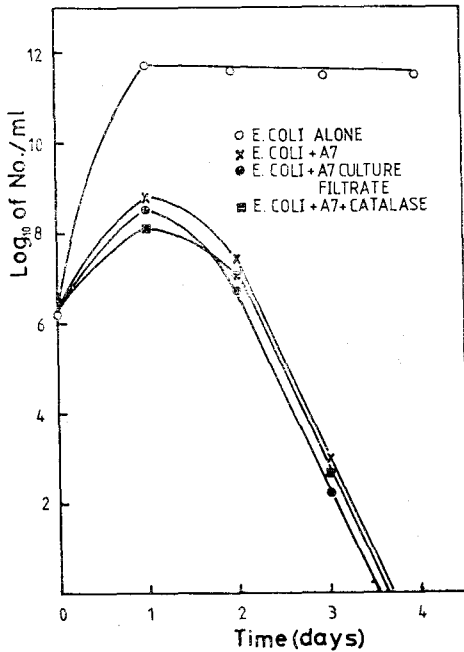


Fig. 4. Effect of A7, A7 culture filtrate, and A7 with catalase on the growth of E. coli.

Table 4. Effect of heating (80°C, 30min) and proteolytic enzymes on the inhibitory action of P. cerevisiae A7 culture filtrate added to E. coli.

Additives	Colony count/ml after incubation for	
	0 day	4 days
None	1.6×10 ⁶	3.5×10 ¹¹
Filtrate	1.6×10 ⁶	—
Heat treated filtrate	1.4×10 ⁶	1.0×10 ¹¹
Trypsin treated filtrate (100unit/ml)	1.1×10 ⁶	5.7×10 ⁹
Pepsin treated filtrate (100 unit/ml)	1.1×10 ⁶	—

육 저해 작용에 아무 영향이 없는 것으로 나타났으므로 A7의 생육 저해 작용은 H₂O₂생성과 관련이 없는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 A7은 젖산이나 H₂O₂가 아닌 생육 저해 물질을 생산 분비하는 것으로 추정할 수 있다. 지금까지 알려진 젖산균의 항생물질 또는 bacteriocin은 주로 polypeptide로 밝혀졌으므로^{10,18)} A7 배양 여액에서 이러한 본질의 존재를 확인하기 위하여 열처리와 단백질 분해효소 처리를 하여 E. coli에 대하여 실험한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

여액을 80°C에서 30분간 열처리했을 경우 여액이 나타내던 E. coli에 대한 생육 저해 작용이 거의 파괴되었음을 나타내었으며 trypsin의 처리도 저해효과를 크게 감소시켰으나 pepsin처리에 의해서는 저해 작용에 아무런 영향을 미치지 못하였다 이상의 결과로 Pedicoccus cerevisiae A7에 의한 생육 저해 작용은 이 균주가 생성하는 단백질질의 생육 저해 물질에 의한 것으로 일단 추정할 수 있으나 이 물질의 분리 정제 및 구조 결정에 대하여는 더 연구 검토되어야 할 것이다.

抄 錄

김치에서 분리한 젖산균 20株의 Escherichia coli, Staphylococcus aureus 등 5종의 Test organism에 대한 생육저해실험 결과 가장 생육저해능력이 큰 A7 (Pediococcus cerevisiae)와 C4 (Leuconostoc spp.)를 선발하였다. 이 두 균주를 각각 Escherichia coli와 동시에 접종하여 배양한 결과 초기부터 Escherichia coli의 생육을 억제하였으며 약 24 시간 후부터는 Escherichia coli의 균수가 급격히 감소하였다. Staphylococcus aureus와 Bacillus

*cereuse*에 대하여도 대체로 비슷한 생육억제작용을 나타내었다. 세가지 Test organism 모두 A7과 배양할 경우 C4의 경우보다 더 큰 death rate constant를 나타내었다. 이 혼합 배양액에 catalase를 첨가한 경우 생육저해현상에 영향이 없었으므로 이 두 균주의 생육억제작용은 H₂O₂ 생성과 관련이 없는 것으로 나타났다. A7의 배양 여액만을 *Escherichia coli* 배양액에 첨가한 경우에도 A7 균주의 혼합 배양과 동일한 생육저해 현상을 보였으나 여액을 80°C에서 30분간 열처리후 가하였을 때는 생육저해작용이 거의 나타나지 않을 뿐 아니라 여액에 trypsin 처리한 경우에도 생육저해작용은 크게 억제되었다. 이상의 결과로 A7 균주의 생육저해작용은 단백질류 생육저해물질의 생산에 의한 것이라고 추정할 수 있다.

參 考 文 獻

1. Whitehead, H.R. and Riddet, W.: N.Z.J. Agric., 46 : 225(1938)
2. Juffs, H.S. and Babel, F.J.: J. Dairy sci., 58 : 1612(1975)
3. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: J. Food Sci., 40 : 903(1975)
4. Dubois, G. Baumier, H. and Charbonneau, R.: J. Food Sci., 44 : 1649(1979)
5. Gilliland, S.E. and Speck, M.L.: J. Milk Food Technol., 35 : 307(1972)
6. Haines, W.C. and Harmon, L.G.: Appl. Microbiol., 25 : 436(1973)
7. Sharpe, M.E.: J. Society Dairy Technol., 32 : 9(1979)
8. Price, R.J. and LEE, J.S.: J. Milk Food Technol., 33 : 13(1970)
9. Collins, E.B. and Aramaki, K.: J. Dairy Sci. 63 : 353(1980)
10. Hurst, N.: Advanced Appl. Microbiol. 27 : 85(1981)
11. Shahani, K.M., Vakil, J.R. and Kilara, A.: Cultured Dairy Products J., 11 : 14(1976)
12. Fleming, P.H., Etchells, J.L. and Costilow, R.N. Appl. Microbiol., 30(6) : 1040(1975)
13. Harrigan, W.F. and McCance, M.E.: In "Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology" Academic press(1976)
14. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th edition, Williams & Wilkins (1974)
15. Elliker, P.R. Anderson, A. and Hannessen, G.H.: J. Dairy Sci., 39 : 1611(1956)
16. Chapman, G.H.: J. Bacteriol., 63 : 147(1952)
17. Mossel, D.A.A. Koopman, M.J. and Jongorius, E.: Appl. Microbiol., 15 : 650(1967)
18. Babel, F.J.: J. Dairy Sci., 60 : 185(1977)